


PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/53, 15/29, 15/82, C07K 14/415, A01H 5/00, C12N 9/04</p>	A2	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/06733</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. März 1995 (09.03.95)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP94/00936</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 2. September 1994 (02.09.94)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 43 29 827.3 3. September 1993 (03.09.93) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Bunsenstrasse 10, D-37073 Göttingen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TÖPFER, Reinhard [DE/DE]; Commerstrasse 16, D-50126 Bergheim (DE). HAUSMANN, Lüdger [DE/DE]; Roonstrasse 38, D-50674 Köln (DE). SCHELL, Jozef [BE/DE]; Carl-von-Linné-Weg 12, D-50829 Köln (DE).</p> <p>(74) Anwalt: DRAUDT, Axel, H., Ch.; Maiwald & Partner, Balanstrasse 57, D-81541 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>	
<p>(54) Title: GLYCERIN-3-PHOSPHATE-DEHYDROGENASE (GPDH)</p> <p>(54) Bezeichnung: GLYCERIN-3-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE (GPDH)</p> <p>(57) Abstract</p> <p>DNA sequences that code for a glycerin-3-phosphate-dehydrogenase are disclosed, as well as the alleles and derivatives of said DNA sequences. These sequences are suitable for transforming plants and modifying their biosynthesising ability.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>In der vorliegenden Erfindung werden DNA-Sequenzen, die für eine Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase kodieren, und die Allele sowie Derivate dieser DNA-Sequenzen beschrieben. Diese Sequenzen eignen sich zur Transformation in Pflanzen zur Änderung der Biosyntheseleistung.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

- 1 -

Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH)

Die Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für eine Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH) kodieren, und die Allele sowie die Derivate dieser DNA-Sequenzen.

Die Erfindung betrifft weiterhin genomische Klone, die das vollständige Gen einer Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase und Allele sowie Derivate dieses Gens enthalten.

Die Erfindung betrifft außerdem Promotoren und andere Regulatorelemente der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gene.

Die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH; EC 1.1.1.8), auch als Dihydroxyacetonphosphat-Reduktase bezeichnet, ist maßgeblich durch die Bereitstellung von Glycerin-3-Phosphat an der Triacylglyceridbiosynthese in Pflanzen beteiligt. Die Fettsäure- und Triacylglyceridbiosynthese lassen sich aufgrund der Kompartimentierung als getrennte Biosynthesewege, jedoch im Hinblick auf das Endprodukt, als ein Biosyntheseweg ansehen. Die de novo Biosynthese von Fettsäuren erfolgt in den Plastiden und wird von drei Enzymen bzw. Enzymsystemen katalysiert, d.h. (1) der Acetyl-CoA Carboxylase (ACCase), (2) der Fettsäuresynthase (FAS) und (3) der Acyl-[ACP]-Thioesterase (TE). Die Endprodukte dieser Reaktionsfolge sind in den meisten Organismen entweder Palmitin-, Stearin- und, nach einer Desaturierung, Ölsäure.

Im Cytoplasma dagegen erfolgt die Triacylglyceridbiosynthese im sogenannten "Kennedy Pathway" am Endoplasmatischen Reticulum aus Glycerin-3-Phosphat, das durch die Aktivität der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase bereitgestellt wird (S.A. Finnlayson et al, Arch. Biochem. Biophys. 199, Seiten 179-185

- 2 -

(1980)), und den Fettsäuren, die als Acyl-CoA Substrate vorliegen.

Die enzymatische Aktivität der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase wurde bei Pflanzen wahrscheinlich erstmals in Kartoffelknollen festgestellt (G.T. Santora et al, Arch. Biochem. Biophys. 196, Seiten 403-411 (1979)). In anderen Pflanzen konnte diese Aktivität zuvor nicht beobachtet werden (B. König und E. Heinz, Planta 118, Seiten 159-169 (1974)), so daß die Existenz des Enzyms ungeklärt war. Daher wurde die Bildung von Glycerin-3-Phosphat aufgrund der Aktivität einer Glycerin-Kinase als alternativer Biosyntheseweg diskutiert. Später wiesen Santora et al, supra, die GPDH in Spinatblättern nach und konnten das Enzym etwa um das 10 000-fache anreichern. Sie bestimmten das native Molekulargewicht mit 63,5 kDa und zeigten pH-Optima für die Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) von 6,8 bzw. 9,5 für die Rückreaktion. Aus Rizinus-Endosperm wurde die GPDH ebenfalls nachgewiesen (Finlayson et al, Arch. Biochem. Biophys. 199, Seiten 179-185 (1980)). Nach jüngeren Arbeiten (Gee et al, Plant Physiol. 86, Seiten 98-103 (1988a)) konnten in angereicherten Fraktionen zwei GPDH-Aktivitäten, eine cytoplasmatische (20-25%) und eine plastidäre (75-80%) festgestellt werden. Beide Formen werden unterschiedlich reguliert. So ist beispielsweise die cytoplasmatische Isoform durch F2,6DP aktivierbar, während die plastidäre Isoform durch Thio-redoxin aktiviert wird (R.W. Gee et al, Plant Physiol. 86, Seiten 98-103 (1988) und R.W. Gee et al, Plant Physiol. 87, Seiten 379-383 (1988)).

Molekularbiologische Methoden halten zunehmend Einzug in die pflanzenzüchterische Praxis. Mit Hilfe der Genmanipulation, z.B. Übertragung von Genen, die für Enzyme kodieren, können Änderungen in der Biosyntheseleistung unter Bildung neuer Inhaltsstoffe und/oder höherer Erträge dieser Inhaltsstoffe erzielt werden. Die GPDH als eines der wichtigsten Enzyme in

- 3 -

der Triacylglyceridsynthese übt einen wesentlichen Einfluß auf die Ölproduktion von Pflanzen aus.

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, den Ölertrag von Nutzpflanzen durch Beeinflussung des Triacylglyceridgehalts zu verbessern.

Diese Aufgabe wird mit den DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1 und den Genen aus den genomischen Klonen gemäß Patentanspruch 4 gelöst.

Die Erfindung betrifft DNA-Sequenzen, die für eine Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase kodieren, und die Allele sowie Derivate dieser DNA-Sequenzen.

Die Erfindung betrifft weiterhin genomische Klone, die ein vollständiges Gen einer Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase umfassend das Strukturgen, den Promotor und andere Regulatorsequenzen, und die Allele sowie Derivate dieses Gens enthalten.

Die Erfindung betrifft ebenso die Promotoren und andere Regulatorelemente der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gene aus den genannten genomischen Klonen, und die Allele sowie Derivate dieser Promotoren.

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur Herstellung von Pflanzen, Pflanzenteilen und Pflanzenprodukten, deren Triacylglyceridgehalt bzw. Fettsäuremuster verändert ist, bei dem die genannten DNA-Sequenzen bzw. die Gene aus den genomischen Klonen auf gentechnologischem Weg übertragen werden.

Die Erfindung betrifft zudem die Verwendung der genannten DNA-Sequenzen oder eines der aus den genannten genomischen Klonen

- 4 -

stammenden Gens zur Veränderung des Triacylglyceridgehalts bzw. dessen Fettsäuremuster in Pflanzen.

Die Erfindung betrifft schließlich transgene Pflanzen, Pflanzenteile und Pflanzenprodukte, die nach dem zuvor genannten Verfahren hergestellt worden sind.

Die Figuren dienen zur Erläuterung der vorliegenden Erfindung.

Es zeigen:

- Figur 1** den Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der cDNAs ClGPDH30 und ClGPDH109 sowie des Gens aus dem genomischen Klon ClGPDHg3 mit der GPDH-Aminosäuresequenz der Maus (Mm GPDH);
- Figur 2** die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen aus BB26-36-Zellen;
- Figur 3** die Kartierung der in den genomischen Klonen ClGPDHg5, ClGPDHg9 und ClGPDHg3 enthaltenen Insertionen mit verschiedenen Restriktionsenzymen;
- Figur 4** die schematische Darstellung der funktionellen Bereiche der in den genomischen Klonen ClGPDH5, ClGPDH9 und ClGPDH3 enthaltenen Gene; und
-
- Figur 5** den Northern Blot mit RNAs aus verschiedenen Pflanzengeweben, hybridisiert mit der cDNA ClGPDH20 als Sonde.

- 5 -

Es ist selbstverständlich, daß im Rahmen der Erfindung auch allelische Varianten und Derivate der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen bzw. Gene erfaßt sind, unter der Voraussetzung, daß diese modifizierten DNA-Sequenzen bzw. die modifizierten Gene für die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase kodieren. Zu den allelischen Varianten und Derivaten zählen beispielsweise Deletionen, Substitutionen, Insertionen, Inversionen oder Additionen der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen bzw. Gene.

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von cDNAs, die für Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase kodieren, ist jedes Pflanzenmaterial geeignet, das dieses Enzym in ausreichender Menge produziert. Als besonders geeignetes Ausgangsmaterial haben sich in der vorliegenden Erfindung isolierte Embryonen aus der in Mittelamerika beheimateten Pflanze *Cuphea lanceolata* erwiesen.

Zur Isolierung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen wurde eine funktionelle Komplementation angewendet. Hierbei handelt es sich um die Komplementation von Mutanten eines Mikroorganismus mit heterologer cDNA. Die funktionelle Komplementation erfolgte nach Infektion des *E.coli*-Stammes BB26-36, der für Glycerin auxotroph ist, mit Phagemids, die Plasmide mit cDNAs aus *Cuphea lanceolata* enthalten. Aus funktionell komplementierten Bakterien wurden Plasmide isoliert, welche mit Restriktions-Endonukleasen gespalten und elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Die in den Plasmiden enthaltenen cDNAs konnten in zwei Klassen eingeteilt werden, die sich durch die Größe der Insertionen unterscheiden ließen. Die Retransformation bestätigte, daß die isolierten cDNAs in der Lage waren, die Mutante BB26-36 zu komplementieren.

Der vollständige kodierende Bereich einer der beiden Klassen kodiert für eine Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase und ist in dem cDNA-Klon ClGPDH20 enthalten. Es handelt sich hierbei um

- 6 -

ein Eco RI-ApaI-Fragment, das eine Größe von 1354 bp aufweist. Die vollständige 1354 bp DNA-Sequenz der cDNA ClGPDH20 und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz ist als SEQ ID NO:1 im Sequenzprotokoll gezeigt. Die cDNA ClGPDH20 wurde doppelsträngig sequenziert. Ausgehend vom Startkodon "ATG" kodiert die cDNA von Position 17 bis 1132 für ein Protein mit 372 Aminosäuren (Ende beim Stopkodon "TAG"), das ohne Leserasterverschiebung als Fusion zu lacZ exprimiert wird. Das errechnete Molekulargewicht beträgt 40,8 kDa. Vor dem "ATG" befinden sich zwei Basenpaare (CA), die zur cDNA zu zählen sind. Die ersten 14 Nukleotide sind der DNA-Sequenz der Fusion mit lacZ zuzuordnen, und am 3'-Ende ist die Linkersequenz angegeben. Das PolyA-Signal befindet sich an den Positionen 1329 bis 1334 im 3'-nicht translatierten Bereich.

Es ist anzunehmen, daß die cDNA ClGPDH20 eine cytoplasmatische Isoform darstellt, da bei Homologievergleichen mit der GPDH der Maus (siehe Figur 1) ein Transitpeptid nicht erkennbar ist. Aufgrund der Lage einer mutmaßlichen NADH-Bindungsstelle, die der Konsensus-Sequenz GxGxxG entspricht (siehe Positionen 29 bis 34 in der Aminosäuresequenz von ClGPDH20 in Figur 1 (R.K. Wierenga et al, Biochem 24, Seiten 1346-1357 (1985)) reicht die N-terminale Sequenz von 28 Aminosäuren nicht aus, um für ein Transitpeptid zu kodieren, deren Länge zwischen 32 und 75 Aminosäuren variiert (Y. Gavel et al, FEBS Lett 261, Seiten 455-458 (1990)).

Zur Isolierung weiterer GPDH cDNAs wurde eine cDNA-Bank aus *Cuphea lanceolata* mit der cDNA ClGPDH20 als Sonde durchsucht, wobei insgesamt 52 cDNA-Klone isoliert wurden. Die 18 längsten cDNAs wurden vollständig oder zum Teil sequenziert. cDNAs mit dem vollständigen kodierenden Bereich bzw. eine fast vollständige cDNA der GPDH sind in den cDNA-Klonen ClGPDH109, ClGPDH30 und ClGPDH132 enthalten.

- 7 -

Der cDNA-Klon ClGPDH109 enthält auf einem 1464 bp EcoRI-ApaI-DNA-Fragment den vollständigen kodierenden Bereich der GPDH, der für ein Protein mit 381 Aminosäuren kodiert. Die DNA-Sequenz sowie die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz ist als SEQ ID NO:2 im Sequenzprotokoll wiedergegeben. Das DNA-Fragment wurde doppelsträngig sequenziert. Der kodierende Bereich beginnt mit dem Startkodon "ATG" an Position 45 und endet an Position 1187, woran sich das Stopkodon "TAG" (Positionen 1188 bis 1190) anschließt. Die cDNA selbst beginnt an Position 15. Die ersten 14 Nukleotide sind der DNA-Sequenz der Fusion mit lacZ zuzuordnen. Im nicht translatierten Bereich am 3'-Ende befinden sich das PolyA-Signal (Positionen 1414 bis 1419) und der PolyA-Bereich (Positionen 1446 bis 1454) sowie die Linkersequenz (Positionen 1459 bis 1464).

Eine weitere cDNA, ClGPDH30, enthält ebenfalls auf einem 1390 bp EcoRI-XhoI-Fragment den vollständigen kodierenden Bereich der GPDH, der für ein Protein mit 372 Aminosäuren kodiert. Die doppelsträngig sequenzierte DNA-Sequenz und die daraus abgeleitete DNA-Sequenz ist als SEQ ID NO:4 im Sequenzprotokoll gezeigt. Die proteinkodierende Sequenz beginnt mit dem Startkodon "ATG" an Position 34 und endet vor dem Stopkodon an Position 1149. Die ersten 14 Basenpaare sind der Sequenz der Fusion mit lacZ zuzuordnen. Im 3'-nicht translatierten Bereich befinden sich das PolyA-Signal (Positionen 1349 bis 1354) und der PolyA-Bereich (Positionen 1366 bis 1384).

Der cDNA-Klon ClGPDH132 mit einer Größe von 1490 bp liegt als Eco RI-XhoI-Fragment vor, dessen DNA-Sequenz sowie die davon abgeleitete Aminosäuresequenz als SEQ ID NO:3 im Sequenzprotokoll gezeigt ist. Das DNA-Fragment wurde doppelsträngig sequenziert. Im Vergleich zur cDNA ClGPDH109 fehlen der cDNA ClGPDH132 14 Aminosäuren am N-Terminus. Das offene Leseraster beginnt an Position 15 und endet an Position 1115, gefolgt vom Stopkodon an den Positionen 1116 bis 1118. Somit kodiert die

- 8 -

cDNA ClGPDH132 für ein Protein mit 367 Aminosäuren und umfaßt mit Ausnahme von 14 Aminosäuren ebenfalls den kodierenden Bereich der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase. Die ersten 14 Nukleotide sind der Sequenz der Fusion mit lacZ zuzuordnen und am 3'-Ende befindet sich die Linkersequenz (Positionen 1485 bis 1490). Das PolyA-Signal sowie der PolyA-Bereich sind an den Positionen 1343 bis 1348 bzw. 1465 bis 1484 im nicht translatierten 3'-Bereich lokalisiert.

Aufgrund der Sequenzdaten können zwei Klassen von cDNAs unterschieden werden. Danach gehören die cDNAs ClGPDH20 und ClGPDH30 zur Klasse A und die cDNAs ClGPDH132 und ClGPDH109 zur Klasse B.

Wie aus Figur 1 zu erkennen ist, zeigen die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der cDNAs ClGPDH30 und ClGPDH109 96% identische Aminosäuren. Gleichzeitig wurden die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der cDNAs und die des eines zu einer weiteren Klasse zuzuordnenden Gens, ClGPDH30, mit der GPDH-Aminosäuresequenz der Maus (MmGPDH) verglichen. Die Unterschiede der von der cDNA ClGPDH109 abgeleiteten Aminosäuresequenz, der kodierten Aminosäuresequenz des Gens und der GPDH der Maus im Vergleich zur abgeleiteten Aminosäuresequenz von ClGPDH30 sind schwarz unterlegt. Im Mittel besteht eine Identität der abgeleiteten Proteine der cDNAs und des GPDH-Gens zum Protein der Maus von etwa 50%.

Die cDNA ClGPDH20 wurde in einen Expressionsvektor kloniert und als Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase in E.coli exprimiert. Dazu wurde die cDNA mit dem "ATG" beginnend (siehe Position 17, SEQ ID NO:1) in ein Derivat des Expressionsvektors pGEXKG (K.L. Guan et al, Analytical Biochem. 192, Seiten 262-267 (1991)), pGX, kloniert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe von IPTG (Isopropyl- β -thiogalactopyranosid) wurden BB26-36-Zellen geerntet und

- 9 -

deren Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. In Figur 2 ist die gelelektrophoretische Auftrennung der BB26-36-Zell-extrakte gezeigt. In der linken Spalte sind die Proteine von Zellen mit dem Expressionsvektor pGX (ohne Fusion; 26 kDa Protein) zu erkennen, während dessen auf der rechten Seite Proteine von Zellen mit dem Expressionsvektor pGXGPDH20, der ein Fusionsprotein von 67 kDa kodiert, aufgetragen worden ist. Die angegebenen Stundenwerte geben die Zeiten der Probe-entnahme nach IPTG-Induktion an. Man sieht deutlich eine Anreicherung des Fusionsproteins nach zwei Stunden. Mit isoliertem Fusionsprotein wurde anschließend eine Enzymaktivitätsbestimmung in einem Enzymassay der GPDH durchgeführt und signifikante Enzymaktivität gemessen. Dieses Ergebnis belegt eindeutig, daß die cDNA ClGPDH20 ein funktionsfähiges Gen für die Expression von GPDH enthält.

Des weiteren wurden genomische Klone isoliert, wobei eine Bank aus genomischer DNA von *Cuphea lanceolata* mit der cDNA ClGPDH20 als Sonde gescreent wurde. Auf diese Weise konnten 31 genomische Klone isoliert werden. Die genomischen Klone enthalten ein vollständiges Strukturgen einer Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase und die Allele sowie Derivate dieses Gens zusammen mit der Promotorsequenz und anderen Regulator-elementen. Das bedeutet also, daß sie vollständige Transkriptionseinheiten bilden.

Drei genomische Klone werden nachfolgend charakterisiert. Es handelt sich dabei um den genomischen Klon ClGPDHg3 mit einer DNA-Insertion von 15,9 kb, den genomischen Klon ClGPDHg5 mit einer DNA-Insertion von 17,7 kb und den genomischen Klon

ClGPDHg9 mit einer DNA-Insertion von 15,6 kb. In Figur 3 ist die Kartierung der DNA-Insertionen der genomischen Klonen mit verschiedenen Restriktionsenzymen gezeigt. Die schwarzen Balken kennzeichnen die Fragmente, die mit einer 5'-Sonde der cDNA GPDH20 hybridisieren. Die weißen Balken zeigen die

- 10 -

Bereiche der DNA-Insertionen, die sequenziert wurden und in den Sequenzprotokollen aufgeführt sind.

Die Sequenzanalyse der in Figur 3 angegebenen Bereiche (weiße Balken) der drei genomischen Klone ClGPDHg5, CLGPDHg3 und ClGPDHg9 hat ergeben, daß in diesen das vollständige oder zum Teil vollständige Strukturgen der GPDH mit erheblichen Anteilen der Promotorsequenz bzw. mit der gesamten Promotorsequenz (5'-Richtung) enthalten sind. Eine schematische Darstellung der sequenzierten Bereiche der genomischen Klone ist in Figur 4 wiedergegeben. Die genomischen Klone ClGPDHg5, ClGPDHg9 und ClGPDHg3 enthalten neben Promotorsequenzen die vollständigen Strukturgene der GPDH. Vom genomischen Klon ClGPDHg9 wurde der gesamte Promotor der GPDH sequenziert.

So enthält ein 4434 bp DNA-Fragment des genomischen Klons ClGPDHg5 im 5'-Bereich Teile des Promotors und das vollständige Strukturgen der GPDH. Die doppelsträngig sequenzierte DNA-Sequenz sowie die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sind als SEQ ID NO:5 im Sequenzprotokoll gezeigt. Die durch nicht translatierte DNA-Bereiche (Introns) unterbrochene proteinkodierende Sequenz mit 372 Aminosäuren beginnt mit dem Startkodon "ATG" an Position 1394 und endet vor dem Stopkodon "TAG" an Position 4005. Die putative TATA-Box befindet sich an den Positionen 1332 bis 1336. Der mutmaßliche Transkriptionsstart ist bei Position 1364 (Joshi, NAR 15, Seiten 6643 bis 6653, 1987). Das PolyA-Signal befindet sich am 3'-Ende an den Positionen 4205 bis 4210. Die Position 4221 entspricht dem letzten Nukleotid vor dem PolyA-Bereich der cDNA ClGPDH30 (siehe Position 1365 im SEQ ID NO:4).

Das vollständige Strukturgen der GPDH sowie Teile des Promotors in 5'-Richtung sind in einem 4006 bp DNA-Fragment aus dem genomischen Klon ClGPDHg3 enthalten. Die weitgehend

- 11 -

doppelsträngig sequenzierte DNA-Sequenz des DNA-Fragments aus ClGPDHg3 sowie die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sind als SEQ ID NO:6a und SEQ ID NO:6b im Sequenzprotokoll gezeigt. Der durch Intronsequenzen unterbrochene proteinkodierende Bereich beginnt an Position 1182 (siehe SEQ ID NO:6a) mit dem Startkodon "ATG" und endet vor dem Stopkodon "TAG" an Position 190 (siehe SEQ ID NO: 6b). Die Signalsequenzen CAAT-Box und TATA-Box befinden sich vor dem Transkriptionsstart an den Positionen 1055 bis 1058 und 1103 bis 1107. Mutmaßliche Transkriptionsstartpunkte sind an den Positionen 1136 und 1148. Aufgrund fehlender Sequenzdaten ist innerhalb der kodierenden Sequenz ein Bereich von etwa 480 bp nicht identifiziert. Das PolyA-Signal befindet sich im nicht translatierten 3'-Bereich an den Positionen 393 bis 398. (SEQ ID NO:6b).

Der gesamte Promotor sowie das erste Exon der für eine GPDH kodierenden Sequenz sind in einem 1507 bp DNA-Fragment aus dem genomischen Klon ClGPDHg9 enthalten. Die weitgehend doppelsträngig sequenzierte DNA-Sequenz sowie die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sind als SEQ ID NO:7 im Sequenzprotokoll wiedergegeben. Die TATA-Box befindet sich vor dem Transkriptionsstart an den Positionen 1108 bis 1112. Die proteinkodierende Sequenz beginnt mit dem Startkodon "ATG" an Position 1193 und endet an Position 1376, wo ein nicht translatierter Bereich (Intron) beginnt. Der mutmaßliche Transkriptionsstart ist bei Position 1144.

Aufgrund von DNA-Sequenzvergleichen ist festgestellt worden daß die cDNA ClGPDH30, die ein vollständiges Proteinleseraher für die GPDH umfaßt, identisch zu dem GPDH-Gen aus dem genomischen Klon ClGPDHg5 ist. Somit läßt sich der genomische Klon ClGPDHg5 in die Klasse A (siehe oben) einordnen. Die cDNA ClGPDH132 mit einem fast vollständigen Proteinleseraher für die GPDH ist identisch zu dem Gen aus dem genomischen Klon

- 12 -

ClGPDH_{g9}, der sich somit in die Klasse B (siehe oben) einordnen läßt. Das Gen aus dem genomischen Klon ClGPDH_{g3} konnte keiner der beiden Klassen zugeordnet werden und bildet daher eine weitere Klasse C.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, die für eine Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase kodieren, können unter Anwendung gentechnologischer Verfahren (in Form von anti-sense- oder Überexpression) in Pflanzen zur Produktion dieser Dehydrogenasen zwecks Änderung von Biosyntheseleistungen in diesen Pflanzen eingeführt bzw. übertragen werden. Die erfindungsgemäße DNA-Sequenzen werden, soweit sie nicht als vollständige Transkriptionseinheit vorliegen, vorzugsweise zusammen mit geeigneten Promotoren, insbesondere in rekombinanten Vektoren, wie beispielsweise binäre Vektoren, in die Pflanzen eingeführt. Die genomischen Klone können als eigene vollständige Transkriptionseinheiten zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, um Einfluß auf den Triacylglyceridgehalt und dessen Fettsäuremuster zu nehmen.

Alle Arten von Pflanzen können für diesen Zweck transformiert werden. Es werden bevorzugt Ölpflanzen, wie beispielsweise Raps, Sonnenblume, Lein, Ölpalme und Soja, transformiert, um in diesen Pflanzen die Triacylglyceridbiosynthese in gewünschter Weise zu beeinflussen.

Die gentechnologische Einführung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen, die für eine Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase kodieren sowie der in den genomischen Klonen enthaltenen vollständigen Gene einer Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase können mit Hilfe üblicher Transformationstechniken durchgeführt werden. Solche Techniken umfassen Verfahren wie direkten Gentransfer, wie beispielsweise Mikroinjektion, Elektroporation, Particle gun, das Quellen von Pflanzenteilen in DNA-Lösungen, Pollen- oder Pollenschlauchtransformation,

- 13 -

virale Vektoren und Liposomen- vermittelten Transfer sowie die Übertragung von entsprechenden rekombinanten Ti-Plasmiden oder Ri-Plasmiden durch *Agrobacterium tumefaciens* und die Transformation durch Pflanzenviren.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen sowie die in den genomischen Klonen enthaltenen vollständigen Gene einer Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase sind in hervorragender Weise geeignet, in transgenen Pflanzen eine beträchtliche Ölertragssteigerung hervorzurufen. Diese Ölertragssteigerung ist mit einer Erhöhung des Triacylglyceridgehaltes im Samen aufgrund einer Überexpression der GPDH zu erhalten. Darüber hinaus kann durch anti-sense-Expression bzw. Cosuppression eine Reduktion der Glycerin-3-Phosphat-Konzentration erreicht werden, womit Bausteine für die Triacylglyceridsynthese fehlen. Dieser Effekt ist dann von besonderem Nutzen, wenn beispielsweise die Bildung von Wachsestern (Johoba-Wachsester) in den Samen transgener Pflanzen verbessert werden sollen. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen sowie der Gene aus den genomischen Klonen ist darin zu sehen, in transgenen Pflanzen die Triacylglycerid-Biosynthese zu unterdrücken und die CoA-Ester sowie Glycerin-3-Phosphat für andere Biosynthesen verfügbar zu machen.

Des weiteren sind die Promotoren der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gene aus den erfindungsgemäßen Klonen beispielsweise einsetzbar für eine gerichtete Expression chimärer Gene in embryospezifischem Gewebe. Aufgrund experimenteller Daten ist im Hinblick auf die Spezifität der Promotoren anzunehmen, daß die Promotoren der Gene aus den genomischen Klonen ClGPDHg5 und ClGPDHg9 samenspezifisch sind, währenddessen der Promotor des Gens aus dem genomischen Klon ClGPDHg3 im Embryo nicht oder nicht sehr aktiv ist. So eignen sich beispielsweise ein 1387 bp BamHI/AlwNI-Fragment aus ClGPDHg5 für transkriptionelle Fusionen, ein 1189 bp SphI/NarI-Fragment

- 14 -

aus ClGPDH_{g9} für translationelle Fusionen und ein 1172 bp BamHI/BsmAI(part.)-Fragment aus ClGPDH_{g3} für transkriptionelle Fusionen. Größere (oder auch kleinere) Promotorfragmente lassen sich aufgrund der auf den genomischen Klonen darüber hinaus vorhandenen klonierten Abschnitten zur Expression chimärer Gene heranziehen. Ebenfalls regulatorische Sequenzen, die sich möglicherweise downstream des ersten Kodons der GPDH-Gene befinden, sind für eine gezielte Expression chimärer Gene aus den klonierten Fragmenten aus genomischer DNA zu erhalten.

Eine Northern-Blot-Analyse mit polyA⁺-RNA aus verschiedenen Geweben von *Cuphea lanceolata* mit der cDNA ClGPDH₂₀ als Sonde zeigt sehr große Mengen an RNA in Embryonen im Vergleich zu anderen Geweben (siehe Figur 5). Die RNA-Akkumulation ist mit einer erhöhten Genexpression korreliert und deutet somit auf einen außerordentlich starken Promotor.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung.

BEISPIELE

Das im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendete Pflanzenmaterial stammte von *Cuphea lanceolata* (Lythraceae) (lanzettblättriges Köcherblümchen oder Höckerblümchen).

Beispiel 1

Herstellung von cDNAs der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase aus *Cuphea lanceolata*

Die Herstellung einer cDNA-Bank aus *Cuphea lanceolata* (Wildtyp) erfolgte mit Hilfe des cDNA ZAP[®]-Synthesekits gemäß den Angaben des Herstellers (Stratagene, La Jolla USA). Als Ausgangsmaterial zur Synthese der cDNAs wurde mRNA aus iso-

- 15 -

lierten, etwa zwei bis drei Wochen alten, unreifen Embryonen verwendet. Die auf diese Weise erhaltene cDNA-Bank hat eine Größe von $9,5 \times 10^5$ rekombinanten Phagen.

Die funktionelle Komplementation zur Isolation von cDNAs, die für eine Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase kodieren, wurde mit dem E.coli Bakterienstamm BB26-36 (R.M. Bell, J. Bact. 117, Seiten 1065-1076 (1974)) durchgeführt. Das Bakterienmedium wurde zur Kultur von BB26-36, der unter anderem, die Mutationen *plsB26* und *plsX* trägt, 0,1% Glycerin zugegeben und somit die Bakterien supplementiert. Zur funktionellen Komplementation wurde Medium ohne Glycerin verwendet.

Aus der oben beschriebenen cDNA-Bank in λ -ZAP II wurden die pBluescript-Plasmide mit den cDNA-Insertionen gemäß den Herstellerangaben (Stratagene) durch in vivo Excision mittels Helferphagen ausgeschnitten und in Phagenhüllen verpackt: Es wurden 200 μ l XL1Blue E.coli-Zellen ($OD_{600} = 1$) mit 5×10^6 pfu der λ -ZAP II cDNA-Bank und, um eine Koinfektion zu gewährleisten, mit einer zehnfachen Menge an fl-Helferphagen R408 infiziert. Nach einer 15 Minuten langen Inkubation bei einer Temperatur von 37°C zur Phagenadsorption wurden 5 ml 2xYT-Medium hinzugegeben und für weitere drei Stunden bei einer Temperatur von 37°C geschüttelt. Während dieser Zeit sekretieren die Zellen die pBluescript-Plasmide, welche in die Hüllen der Helferphagen verpackt sind, die sogenannten Phagemids, ins Medium. Durch eine 20 Minuten lange Hitzebehandlung bei 70°C wurden die Bakterien abgetötet und die λ -Phagen inaktiviert. Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, der neben den Phagemids Helferphagen enthält. Dieser Überstand wurde zur Infektion des Mutantenstamms von BB26-36 verwendet.

Die Komplementation erfolgte nach Infektion des E.coli-Stammes BB26-36 mit denjenigen Phagemids, die Plasmide mit cDNAs

- 16 -

enthalten, die für eine Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase kodieren. Zur Selektion wurde M56-LP-Medium (Bell, supra) mit 50 µg Ampicillin eingesetzt (ohne Glycerin-3-Phosphat). Die Retransformation von BB26-36 erfolgte nach der Methode von D. Hanahan, J.Mol.Biol. 166, Seiten 557-580, (1983) mit anschließender Plattierung auf das genannte selektive Medium.

Zur Bestimmung der Sequenz der DNA-Fragmente der positiven cDNA-Klone wurden Deletionsklone mittels Exonuclease III hergestellt (Stratagene), die nach der Methode von Sanger et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 74, Seiten 5463-5467 (1977) sequenziert wurden. Die DNA-Sequenzierung erfolgte teilweise radioaktiv mit Hilfe des ³²P Sequencing® Kits bzw. mit Hilfe eines "Pharmacia Automated Laser Fluorescent A.L.F.®" DNA-Sequenziergerätes. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Computer Software der University of Wisconsin Genetics Computer Group (J. Devereux et al., Nucl. Acids Res. 12, Seiten 387-394 (1984)) analysiert.

Des weiteren wurden cDNA-Klone durch Screenen einer cDNA-Bank aus *Cuphea lanceolata* mit der cDNA ClGPDH20 als Sonde isoliert. Dazu wurde eine cDNA-Bank aus *Cuphea lanceolata* (Wildtyp) mit Hilfe des cDNA ZAP® Synthesekits gemäß den Angaben des Herstellers hergestellt. Ausgangsmaterial zur Synthese der cDNAs war mRNA aus isolierten, etwa zwei bis drei Wochen alten, unreifen Embryonen. Die erhaltene cDNA-Bank hat eine Größe von $9,6 \times 10^5$ rekombinanten Phagen mit einem Anteil von etwa 50% an Klonen, deren Insertionen 500 bp übersteigen. Die cDNA-Bank wurde mit ClGPDH20 als Sonde durchsucht und 18 cDNAs isoliert und teilweise bzw. vollständig in üblicherweise sequenziert. Von diesen cDNAs entfielen 12 auf die Klasse A und 6 cDNAs auf die Klasse B.

- 17 -

Die Enzymmessungen wurden mit dem Fusionsprotein nach dem Protokoll von Santora et al, Arch. Biochem. Biophys 196, Seiten 403-411 (1979)) durchgeführt.

Beispiel 2

Herstellung von genomischen Klonen der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase aus Cuphea lanceolata

Hierzu wurden genomische DNA aus jungen Blättern von Cuphea lanceolata isoliert (S.L. Della Porta et al, Plant.Mol.Biol. Rep. 1, Seiten 19-21 (1983)). Die DNA wurde dann partiell mit dem Restriktionsenzym Sau3A gespalten, wonach DNA-Fragmente der Größenordnung zwischen 11000 bp und 19000 bp in den mit XhoI gespaltenen Vektor λ FIXII (Stratagene) kloniert wurden, nachdem die beteiligten Schnittstellen jeweils mit zwei Nukleotiden partiell aufgefüllt worden waren. Die nicht-vervielfältigte genomische DNA-Bank repräsentierte 5,4 mal das Genom von Cuphea lanceolata. Mit der ClGPDH20-cDNA als Sonde wurden dann aus dieser Bank 31 genomische Klone isoliert.

Unter anderem wurden die drei genomischen Klone ClGPDHg3 (15,9 kb DNA-Insertion), ClGPDHg5 (17,7 kb DNA-Insertion) und ClGPDHg9 (15,6 kb DNA-Insertion) näher charakterisiert. Dazu wurden geeignete Subklone in üblicher Weise hergestellt und deren DNA-Insertionen mit dem ExoIII/Mungbean Kit, und zur Überbrückung von Lücken, mit Oligonukleotidprimern sequenziert.

Sollten in irgendeiner Weise molekularbiologische Arbeiten nicht hinreichend beschrieben worden sein, so wurden diese nach Standardmethoden, wie bei Sambrook et al, A laboratory Manual, 2nd edn. (1989) beschrieben, durchgeführt.

Patentansprüche

1. DNA-Sequenzen, die für eine Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase kodieren, und die Allele sowie Derivate dieser DNA-Sequenzen.
2. DNA-Sequenzen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus Pflanzen isoliert sind.
3. DNA-Sequenzen nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus *Cuphea lanceolata* isoliert sind.
4. Genomische Klone, die ein vollständiges Gen einer Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase und die Allele sowie Derivate dieses Gens enthalten.
5. Genomische Klone nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das vollständige Gen neben dem Strukturgen die Promotorsequenz und andere Regulatorelemente umfaßt.
6. Genomische Klone nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus genomischer Pflanzen-DNA isoliert sind.
7. Genomische Klone nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanzen-DNA von *Cuphea lanceolata* stammt.
8. Promotoren und andere Regulatorelemente der Glycerin-3-Phosphat-Gene aus einem der genomischen Klone nach den Ansprüchen 5 bis 7 und die Allele sowie Derivate dieser Promotoren.
9. DNA-Sequenzen nach Anspruch 1, erhalten durch funktionelle Komplementation mit Mutanten eines Mikroorganismus.

10. DNA-Sequenzen nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Mikroorganismus E.coli BB26-36 ist.
11. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen, Pflanzenteilen
und Pflanzenprodukten, deren Triacylglyceridgehalt bzw.
dessen Fettsäuremuster verändert ist, bei dem eine DNA-
Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder ein aus den
genomischen Klonen stammendes Gen nach einem der
Ansprüche 4 bis 7 auf gentechnologischem Weg übertragen
wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet,
daß die DNA-Sequenz oder das Gen durch Mikroinjektion,
Elektroporation, Particle gun, das Quellen von
Pflanzenteilen in DNA-Lösungen, Pollen- oder
Pollenschlauchtransformation, Übertragung von ent-
sprechenden rekombinanten Ti-Plasmiden oder Ri-Plasmiden
mit Agrobacterium tumefaciens, Liposomen-vermitteltem
Transfer oder durch Pflanzenviren übertragen wird.
13. Verwendung einer DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1
bis 3 oder eines aus den genomischen Klonen stammenden
Gens nach einem der Ansprüche 4 bis 7 zur Änderung der
Biosyntheseleistung in Pflanzen.
14. Pflanzen, Pflanzenteile und Pflanzenprodukte, hergestellt
nach einem Verfahren der Ansprüche 11 oder 12.

1/6

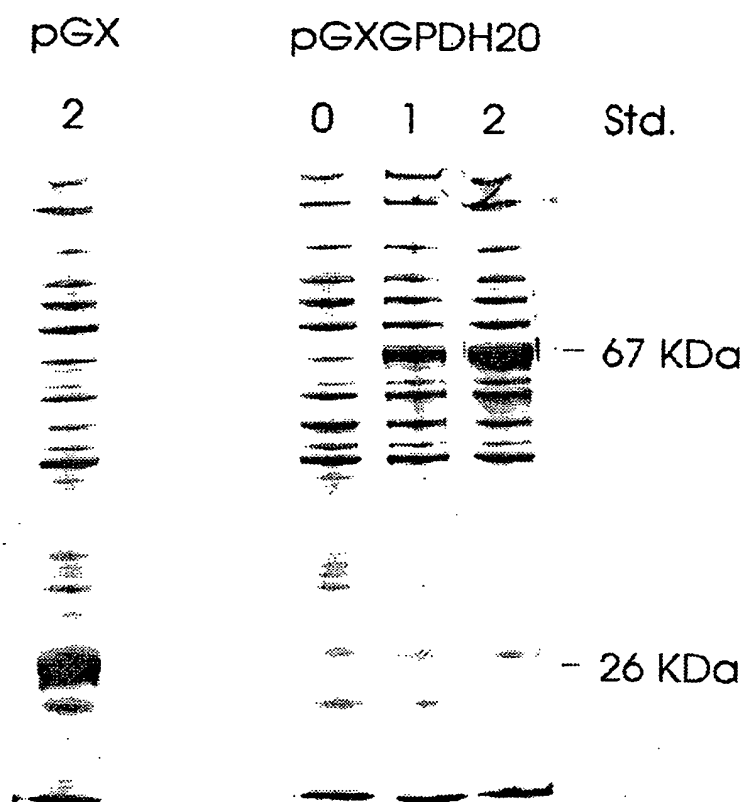
Fig. 1

1	1	50
C1GPDH30M	RSRVTVVSG NWGSVAAKLI
C1GPDH109	MAPAFEPHQL	RSRVTVVSG NWGSVAAKLI
C1GPDH3	RFRVTIIGSG NWGSVAAKLI
MmGPDH	GKKVCIIVSG NWGS AI AK IV
51	51	100
C1GPDH30	ASNTLKLPSF	DVINQTNENV KYLPGIKLGR
C1GPDH109	ASNTLKLPSF	D I INQTNENV KYLPGIKL GG
C1GPDH3	ASNTLNLPSP	EVINR TNENV KYLP GG KLGR
MmGPDH	GSNAGR LAHF	EI INTQ EN V KYLP GG KL PP
101	101	150
C1GPDH30	NVADPDLEN	CKRLVGKIQE GAQALSLIK
C1GPDH109	NVADPDLEN	CKRLVGKIQE GAQALSLIK
C1GPDH3	NV IA DPNLEN	CKRLVGKIK A GA E ALSLIK
MmGPDH	NVVA IP DV VQ	CDQLK CHLKA NTIGI SLIK
151	151	200
C1GPDH30	MEVKMEGPCM	IANEIAVEKF SEATVGFREN
C1GPDH109	MEVKMEGPCM	IANEIAVEKF SEATVGFREN
C1GPDH3	MEVKREGPSM	IANEIA LE KF SEATV G YREN
MmGPDH	VDEGP NG LKL	IA SEVA EE KF CE TT IC CKDP

2/6

C1GPDH30	201	TDIAEKWVQL	FSTPYFMVSA	VEDVEGVELC	GTLKNIVAIA	AGFVDGLEMG	250
C1GPDH109		RDIAEKWVQL	FSTPYFMVSA	VEDVEGVELC	GTLKNIVAIA	AGFVDGLEMG	
C1GPDHg3		KDTAEKWVRL	FNTPYFQVSS	VQDVEGVELC	GTLKNIVAIA	AGFVDGLEMG	
MmGPDH		AQ.GQLLKDL	MQTPNFRITV	VQEVDTEIC	GALKNIVAVG	AGFCDGLGFG	
C1GPDH30	251	NNTKAAIMRI	GLREMKAFSK	LLFPS.VKDT	TFEESCQVAD	LITTCLGGRN	300
C1GPDH109		NNTKAAIMRI	GLREMKAFSK	LLFPS.VKDT	TFEESCQVAD	LITTCLGGRN	
C1GPDHg3		NNTKAAI...	
MmGPDH		DNTKAAVIRL	GLMEMIAFAK	LFCSGTVSSA	TFLESCQVAD	LITTCYGGRN	
C1GPDH30	301	RKVAEAFAKN	GGERSFDDLE	AELLRGQKLQ	GVSTAKEVYE	VLGHRGWLEL	350
C1GPDH109		RKVAEAFAKN	GGNRSFDDLE	AEMLRGQKLQ	GVSTAKEVYE	VLGHRGWLEL	
C1GPDHg3		GVLTAKEVYE	VLKHRGWLER	
MmGPDH		RKVAEAFART	G.KSTIEQLE	KEMLNGQKLQ	GPQTARELHS	ILQHKGLVDK	
C1GPDH30	351	FPLFSTVHEI	STGRLHPSAI	VEYSEQKTIF	SW.		383
C1GPDH109		FPLFSTVHEI	SSGRLPPSAI	VEYSEQKPTF	SW.		
C1GPDHg3		FPLFATVHEI	SSGRLPPSAI	VKYSEQKPVL	SRG		
MmGPDH		FPLFTAIVYKV	CYEGQPVGEF	IRCLQNHPHEH	M..		

3/6

Fig. 2

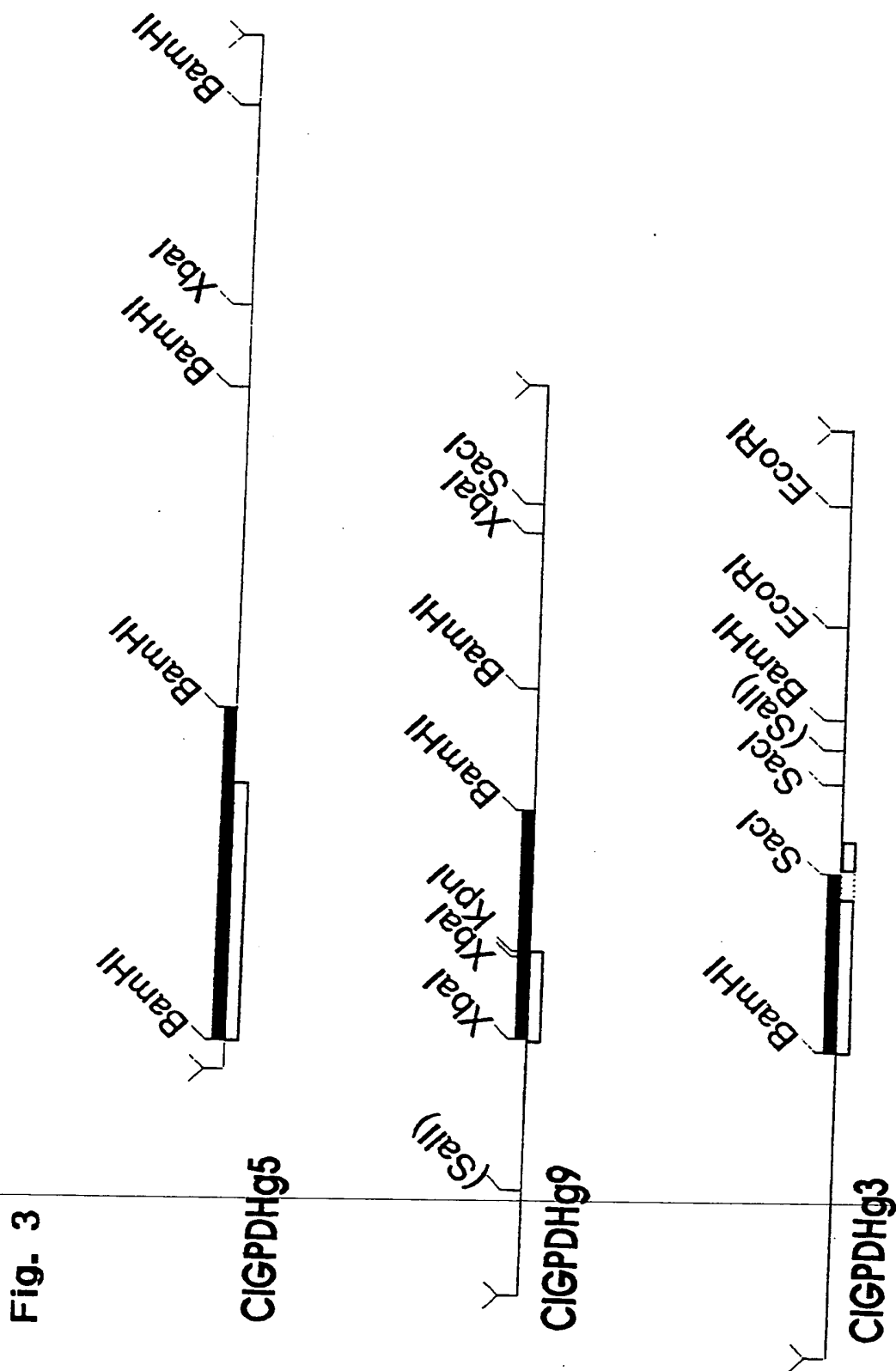
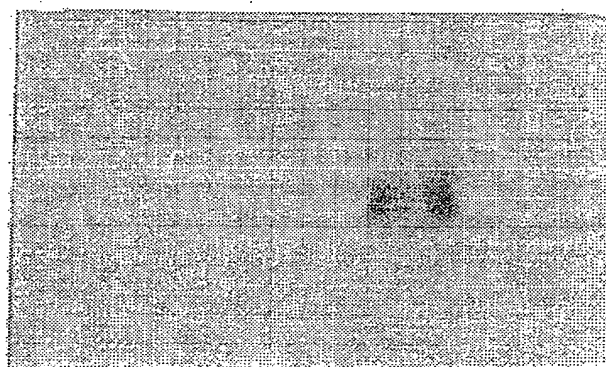


Fig. 3

6/6

Fig. 5

Wurzel
Blüte
Blatt
Embryo
same



1500 nt

1



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12N 15/53, 15/29, 15/82, C07K 14/415, A01H 5/00, C12N 9/04</p>	A3	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/06733</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. März 1995 (09.03.95)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP94/02936</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 2. September 1994 (02.09.94)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 43 29 827.3 3. September 1993 (03.09.93) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Bunsenstrasse 10, D-37073 Göttingen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): TÖPFER, Reinhard [DE/DE]; Commerstrasse 16, D-50126 Bergheim (DE). HAUSMANN, Lüdger [DE/DE]; Roonstrasse 38, D-50674 Köln (DE). SCHELL, Jozef [BE/DE]; Carl-von-Linné-Weg 12, D-50829 Köln (DE).</p> <p>(74) Anwalt: DRAUDT, Axel, H., Ch.; Maiwald & Partner, Balanstrasse 57, D-81541 München (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> <p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- berichts: 20. April 1995 (20.04.95)</p>
<p>(54) Title: GLYCERIN-3-PHOSPHATE-DEHYDROGENASE (GPDH)</p> <p>(54) Bezeichnung: GLYCERIN-3-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE (GPDH)</p> <p>(57) Abstract</p> <p>DNA sequences that code for a glycerin-3-phosphate-dehydrogenase are disclosed, as well as the alleles and derivatives of said DNA sequences. These sequences are suitable for transforming plants and modifying their biosynthesising ability.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>In der vorliegenden Erfindung werden DNA-Sequenzen, die für eine Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase kodieren, und die Allele sowie Derivate dieser DNA-Sequenzen beschrieben. Diese Sequenzen eignen sich zur Transformation in Pflanzen zur Änderung der Biosyntheseleistung.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

PCT/EP 94/02936

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/53 C12N15/29 C12N15/82 C07K14/415 A01H5/00
 C12N9/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol.261, no.25, 5 September 1986, BALTIMORE US pages 11779 - 11785 IRELAND ET AL. 'Primary structure of the mouse glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene' see figure 2	1,4,5, 8-10
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., vol.261, no.25, 5 September 1986, BALTIMORE US pages 11751 - 11755 COOK ET AL. 'Isolation of a genomic clone for Drosophila sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase using synthetic oligonucleotides' see page 11751, left column	1,4,9,10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- '&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search 6 March 1995	Date of mailing of the international search report 13.03.95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Cupido, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

PCT/EP 94/02936

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,92 11373 (E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 9 July 1992 see page 1, line 10 - page 4, line 26 ---	11-14
A	MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, vol.233, no.1/2, May 1992, BERLIN DE pages 122 - 128 KLEIN ET AL. 'Isolation and characterization of cDNA from Cuphea lanceolata encoding a beta-ketoacyl-ACP-reductase' see the whole document -----	3,7
1		

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

Information on patent family members

PCT/EP 94/02936

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Aktenzeichen
PCT/EP 94/02936

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/53 C12N15/29 C12N15/82 C07K14/415 A01H5/00
C12N9/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikations Symbole)
IPK 6 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd.261, Nr.25, 5. September 1986, BALTIMORE US Seiten 11779 - 11785 IRELAND ET AL. 'Primary structure of the mouse glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene' siehe Abbildung 2 ---	1,4,5, 8-10
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., Bd.261, Nr.25, 5. September 1986, BALTIMORE US Seiten 11751 - 11755 COOK ET AL. 'Isolation of a genomic clone for Drosophila sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase using synthetic oligonucleotides' siehe Seite 11751, linke Spalte --- -/-	1,4,9,10

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 6. März 1995	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 13 -03- 1995
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Cupido, M

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO,A,92 11373 (E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 9. Juli 1992 siehe Seite 1, Zeile 10 - Seite 4, Zeile 26 ---	11-14
A	MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, Bd.233, Nr.1/2, Mai 1992, BERLIN DE Seiten 122 - 128 KLEIN ET AL. 'Isolation and characterization of cDNA from Cuphea lanceolata encoding a beta-ketoacyl-ACP-reductase' siehe das ganze Dokument -----	3,7
1		

Angaben zu Veröffentlichung: ☒ zur selben Patentfamilie gehören

PCT/EP 94/02936

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)